

D E C L A R A T I O N

In my capacity as a translator for the English language duly registered, commissioned and sworn in by the President of the Munich I Regional Court (Landgericht München I), I hereby verify the following:

The attached English translation is a true and complete version of GPTO priority document 198 47 779.1 presented to me in the German language.

München, October 6, 2003

Ursula Scherz

URSULA SCHERZ

Translator for the English
language duly registered,
commissioned and sworn in
by the München I Regional Court

Certified translation of a priority document

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

(coat of arms)

**Certification of Priority on the Filing of a Patent
Application**

File No.: 198 47 779.1

Date of Filing: October 16, 1998

Applicant/Patentee: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen
Rechts/Heidelberg, Neckar/Germany

Title: p53 binding areas

IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 Q

**The attached sheets are a true and exact reproduction of
the original documents of this patent application.**

München, September 25, 2003

German Patent and Trademark Office

The President

Seal:

German Patent and
Trademark Office

by order
(signature)

Brosig

p53 Binding Areas

The present invention relates to p53 binding areas (regions) on a CD95 receptor DNA and to the use of the p53 binding regions for influencing apoptosis and/or for identifying substances suitable for this purpose.

p53 is a tumor suppressor which is induced in the case of DNA damage. It then activates target genes so as to achieve growth stand-still in the cells having DNA damage followed by the repair of the DNA damage or death of the cells. The latter is due to apoptosis.

A chemotherapy is to cause DNA damage in tumor cells. This damage shall then lead to the induction of p53 and ultimately to the death of the tumor cells. However, it shows frequently that certain tumor cells are resistant to chemotherapeutic agents or become resistant thereto after a short treatment duration. The reason why this is the case is not really known thus far.

Therefore, it is the object of the present invention to provide a product by which the resistance to chemotherapeutic agents can be investigated and optionally influenced.

According to the invention this is achieved by the subject matters defined in the claims.

The present invention is based on applicant's insights that the induction of p53 by chemotherapeutic agents directly

activates apoptosis. In particular, applicant found that p53 activates CD95-mediated apoptosis in that p53 induces both the expression of the CD95 ligand and that of the CD95 receptor. The latter is due to the fact that p53 binds to CD95 receptor DNA via p53 binding regions. Such binding regions are present in intron 1 and/or the promoter of the CD95 receptor DNA. Moreover, applicant recognized that resistance to chemotherapeutic agents may be due to the fact that p53 can no longer bind to the above p53 binding regions (cf. Table 1 and figures 1-6).

According to the invention applicant's insight are used to provide a p53 binding region of a CD95 receptor DNA.

The term "p53 binding region" comprises any region of a CD95 receptor DNA to which a p53 may bind and activate the CD95 receptor DNA, i.e. may induce it to transcribe. The term "p53" comprises p53 in wild-type form as well as p53 in modified form which still has the above function. A p53 binding region according to the invention may be identified and provided by common methods. It is favorable to cleave a CD95 receptor DNA (cf. Behrmann, I. et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994), 3057-3962) by *Sau* 3A1 and insert the fragments in the *Bam*HI site of pBlueScript II KS⁺. The cloned CD95 receptor DNA fragments are inserted in DNA binding experiments which use cell extracts from tumor cells H1299, which had been transfected beforehand with a p53-coding expression vector, e.g. pCMVp53wt. Bound DNA fragments are fused with a reporter DNA, e.g. luciferase DNA. This may be made e.g. in the expression vectors pGL3-Basic (Promega company) or pTATA-LUC (Wirth, T., Würzburg, Germany). Resulting expression plasmids are tested in luciferase activity tests for their capacity of being activable.

In a preferred embodiment, a p53 binding region comprises the sequence of figure 4 and/or figure 5 or a sequence differing therefrom by one or more base pairs. The expression "a sequence differing by one or more base pairs" comprises any sequence of a CD95 receptor DNA which hybridizes with the DNA of figure 4 and/or figure 5 and to which p53 may bind and which can activate the CD95 receptor DNA. The sequence may differ from the DNA of figure 4 and/or figure 5 by additions, deletions, substitutions and/or inversions of one or more base pairs. The expression "hybridization" refers to hybridization under common conditions, in particular at 20°C below the melting point of the sequence.

A p53 binding region according to the invention may be present as such or in combination with any other DNA. For example, a p53 binding region according to the invention may be present in a vector, optionally in combination with a reporter DNA, e.g. luciferase DNA. Preferred combinations are the DNA constructs CD95(Ps)-LUC, CD95(P)-LUC, CD95(I+SV)-LUC, CD95(Ps+I)-LUC, which are present in the expression vectors pGL3-Basic and/or pTATA-LUC (see below).

A further subject matter of the present invention is a kit comprising a p53 binding region according to the invention (a) and common auxiliary ingredients (b), such as buffers, solvents, carriers, controls, etc. One or more representatives of the p53 binding region may be present. The above explanations also apply correspondingly.

The present invention enables mechanisms resulting when DNA is damaged to be investigated on a molecular level. Such mechanisms comprise the response of the cells to eliminate the DNA damage or to kill themselves. The latter is an

apoptotic process. In particular, the present invention enables mechanisms resulting in a chemotherapy to be investigated. More particularly, it is possible to investigate the cause of resistances to chemotherapeutic agents. For example, it can be determined by means of a p53 binding region according to the invention whether tumor cell-derived p53 is still capable of inducing apoptosis.

The present invention is also suitable to identify substances capable of influencing apoptosis. This influence may be an induction or an inhibition. For this purpose, it is favorable to introduce into cells a p53 binding region according to the invention in combination with a reporter DNA, add thereto the substances to be identified and select them for the trans-activating or trans-inhibiting effect of the substances. p53 binding regions may be activated or inhibited in a CD95 receptor DNA by means of these substances and therefore induce or inhibit apoptosis.

Thus, the present invention provides products or means serving for influencing apoptotic processes. In particular, it is possible to tackle with the resistance to chemotherapeutic agents.

Brief description of the drawings

Figure 1 shows the expression of the CD95 receptor in tumor cells after treating them with chemotherapeutic agents. Clinically relevant concentrations of the chemotherapeutic agents are marked with an asterisk. The tumor cells express p53, no p53 (-/-p53) or p53 disturbed as regards the binding to an inventive p53 binding region of a CD95 receptor DNA (mt p53).

Figure 2 shows the response of tumor cells treated with chemotherapeutic agents to the induction of apoptosis by CD95 receptor stimulation.

Figure 3 shows the expression of the CD95 receptor in tumor cells treated with a chemotherapeutic agent, the tumor cells expressing p53 only after transfection with an expression plasmid coding for p53.

Figure 4 shows a p53 binding region according to the invention (p53 BE) within intron 1 of a CD95 receptor DNA.

Figure 5 shows a p53 binding region according to the invention (p53 BE) within the promoter of a CD95 receptor DNA comprising 9 exons. The promoter has three p53 binding regions.

Figure 6 shows the expression of a luciferase DNA after the binding of p53 to a p53 binding region according to the invention within an expression plasmid containing the luciferase DNA.

The present invention is explained by the below examples.

Example 1: **Detection of the expression of the CD95 receptor in tumor cells treated with chemotherapeutic agents (A) and of the response of these tumor cells to the induction of apoptosis by CD95 receptor stimulation (B).**

(A) The tumor cells HepG2 (human hepatoblastoma), AGS (colon carcinoma) HS746T (gastric carcinoma), MCF-7 (breast cancer), Hep3B (human hepatoblastoma), Huh7 (hepatocellular carcinoma), and HT29 (colon carcinoma) are treated with the chemotherapeutic agents bleomycin, 5-fluorouracil, methotrexate, mitomycin and cisplatin. HepG2, AGS, HS746T and MC-7 express a p53 which binds to a p53 binding region according to the invention. Hep3B expresses no p53. Huh7 and HT29 express a p53 which is disturbed as regards its binding to a p53 binding region according to the invention. The expression of the CD95 receptor is determined by FACSscan. To this end, a biotinylated anti-APO-1 (CD95 receptor) antibody and quantum red-streptavidine (Sigma company) are used as a second reagent for an indirect immunofluorescence (cf. figure 1).

It shows that only the tumor cells HepG2, AGS, HS746T and MCF-7 whose p53 binds to a p53 binding region according to the invention, have CD95 receptor expression.

(B) The tumor cells HepG2, Huh7 and Hep3B (cf. (A)) are treated with the chemotherapeutic agents 5-fluorouracil, methotrexate, mitomycin, cisplatin, mitoxantrone, doxorubicin, etoposide and cyclophosphamide for 48 h or another 24 h in combination with 100 ng/ml IgG3 anti-APO-1 antibodies. The antibody effects CD95 receptor stimulation. The living cell fraction is determined. For this purpose, the MTT test is carried out determining the ability of living cells to reduce soluble yellow tetrazolium salt (MTT) to form blue formazan crystals (cf. figure 2).

It shows that only the tumor cell HepG2 whose p53 binds to a p53 binding region according to the invention responds more intensely to apoptosis induction.

Example 2: Detection of the expression of the CD95 receptor in bleomycin-treated tumor cells, the tumor cells expressing p53 only following transfection.

The tumor cells Hep3B (0.6×10^6 cells) which usually express no p53, are transfected with 1 μ g of the expression vector pCMVp53wt coding for p53 by means of the calcium phosphate coprecipitation method. Thereafter, the tumor cells are treated with bleomycin. The expression of the CD95 receptor is determined by FACScan (cf. Example 1(A); figure 3).

It shows that an expression of the CD95 receptor is obtained by the expression of p53.

Example 3: Detection of the expression of luciferase DNA by p53 binding to a p53 binding region according to the invention.

Expression plasmids are produced, the expression vector pGL3-Basic being used as the vector. The following CD95 receptor DNA/luciferase-DNA constructs are inserted in this vector:

CD95 (Ps) -LUC

The luciferase-DNA is linked via its 5' end with a 1.43 kb promoter region and the 5' end of exon 1 of the CD95 receptor DNA (HindIII-SacII fragment, cf. figures 5 and 6).

CD95 (P) -LUC

The luciferase DNA is linked via its 5' end with a 1.9 kb promoter region and the 5' end of exon 1 of the CD95 receptor DNA (*cf.* figures 5 and 6).

CD95 (I+SV) -LUC

The luciferase DNA is linked via its 5' end with the "minimum" SV40 promoter and a 0.7 kb intron 1 fragment of the CD95 receptor DNA (*cf.* figures 4 and 6).

CD95 (Ps+I) -LUC

The luciferase DNA is linked via its 5' end with a 0.7 kb intron 1 fragment and a 1.43 kb promoter region of the CD95 receptor DNA (*cf.* figures 4 and 6).

The above expression plasmids (1 μ g each) are transfected in Hep3B tumor cells. The expression vector pCMVp53wt (100 ng each) is also transfected. Both transfections are effected by the calcium phosphate coprecipitation method. A common luciferase test is carried out (*cf.* figure 6).

It shows that the DNA constructs CD95(PS)-LUC and CD95(P)-LUC serve for achieving an activation of luciferase which is about 2 times to that of a control. An even more intense activation is obtained when the DNA construct CD95(I+SV)-LUC and in particular the DNA construct CD95(PS+I)-LUC are used. In the latter case, the activation has a factor of about 50.

Table 1

Induction of p53, the CD95 receptor and of apoptosis by chemotherapeutic agent

Chemotherapeutic agent	Mode of action		p53 induction	Induction of apoptosis	CD95 receptor induction	Increased response to induction of apoptosis by CD95 receptor stimulation
Fluorouracil	Antimetabolite	Pyrimidine antagonist	+	+	+	+
Methotrexate	Antimetabolite	Folic acid antagonist	+	+	+	+
Mitomycin	Alkylation		+	+	+	+
Cisplatin	Alkylation		+	+	+	+
Cyclo-phosphamide	Alkylation		+	+	+	+
Mitoxantron	Intercalation		+	+	+	+
Doxorubicin	Intercalation		+	+	+	+
Etoposide	Mitotic blocking	Inhibition of topoisomerase II	+	+	+	+
Bleomycin	Inhibition of DNA polymerase		+	+	+	+

* test for synergism between CD95 receptor stimulation by anti-APO-1 and simultaneous chemotherapeutic treatment: $p < 0.0001$

K 2597

Claims

1. A p53 binding region of a CD95 receptor DNA.
2. The p53 binding region according to claim 1, which comprises the sequence of fig. 4 and/or fig. 5 or a sequence differing therefrom by one or several base pairs.
3. A vector comprising the p53 binding region according to any of claims 1 or 2.
4. The vector according to claim 3, which also comprises a reporter DNA.
5. Use of the p53 binding region according to claim 1 or 2 and/or the vector according to claim 3 or 4 to identify apoptosis-influencing substances.
6. Use according to claim 5, wherein the influence comprises an induction or an inhibition of apoptosis.
7. Use according to claim 5 or 6, wherein the substances are used on the basis of a chemotherapy.
8. A process for influencing apoptosis, comprising the activation or inhibition of the p53 binding region according to any of claim 1 or 2.
9. The process according to claim 8, wherein the influence takes place on the basis of a chemotherapy.

K 2597

Abstract of the Disclosure**p53 binding areas**

The present invention relates to p53 binding regions on a CD95 receptor DNA and to the application of the p53 binding regions to influence apoptosis and/or identify suitable substances therefor.

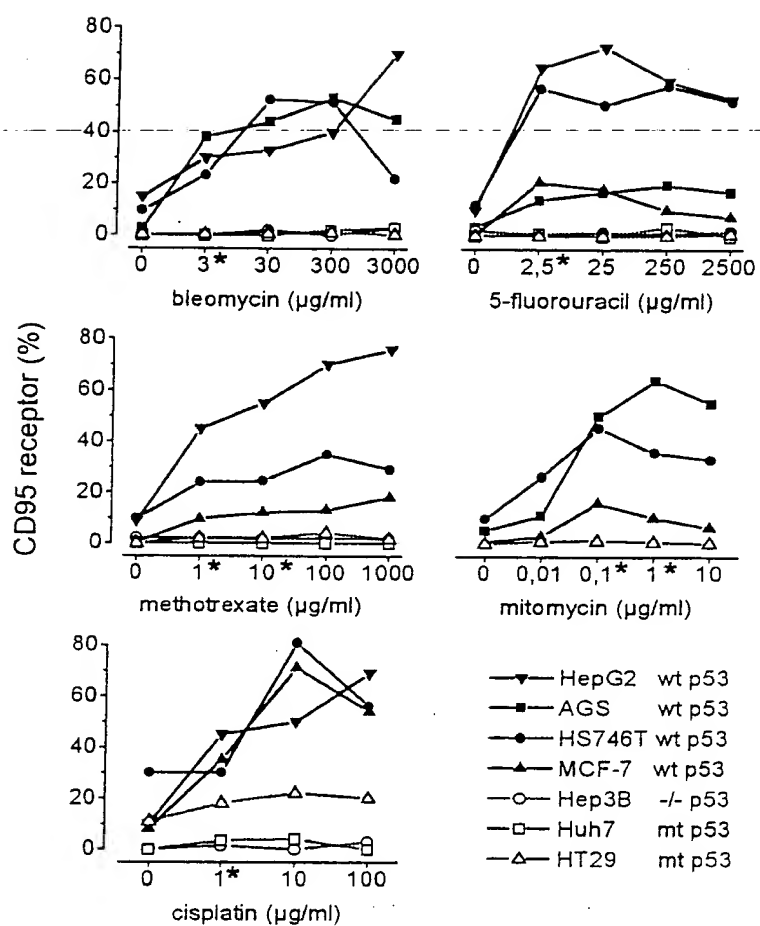


Fig. 1

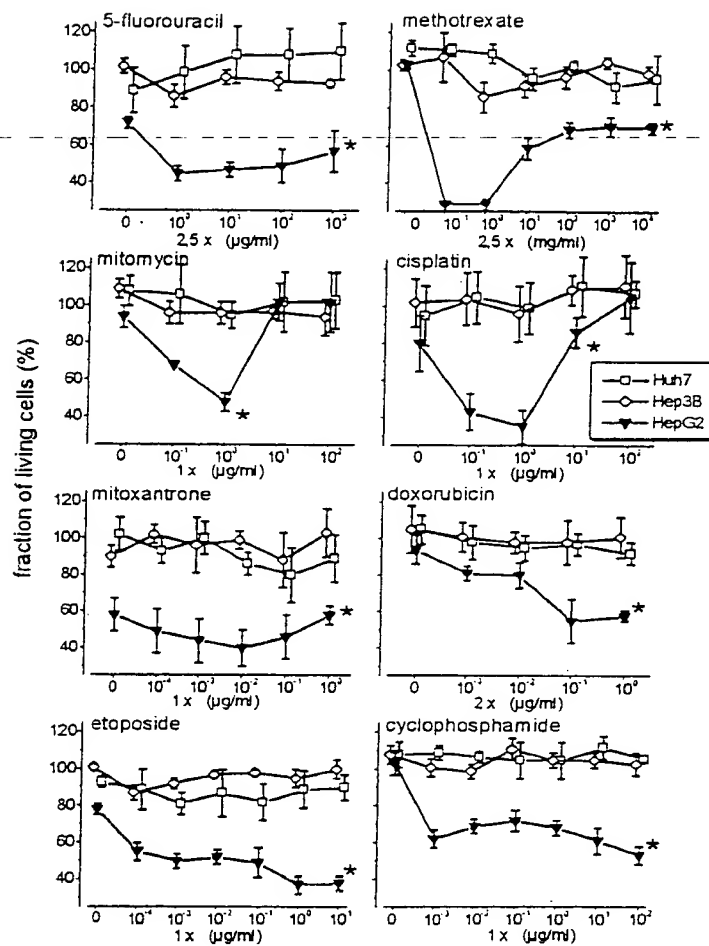


Fig. 2

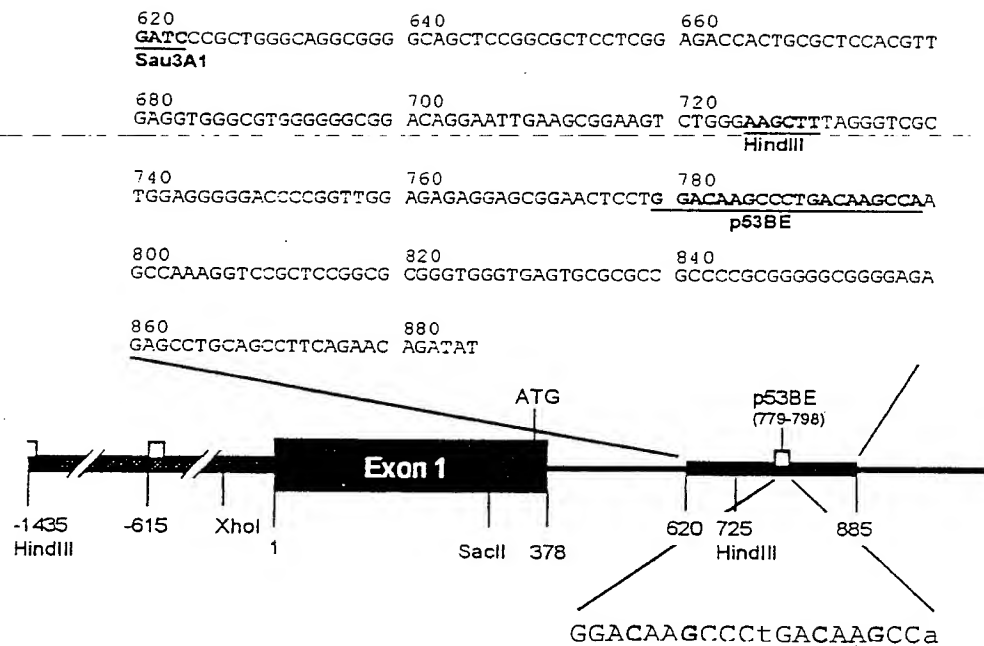


Fig. 4

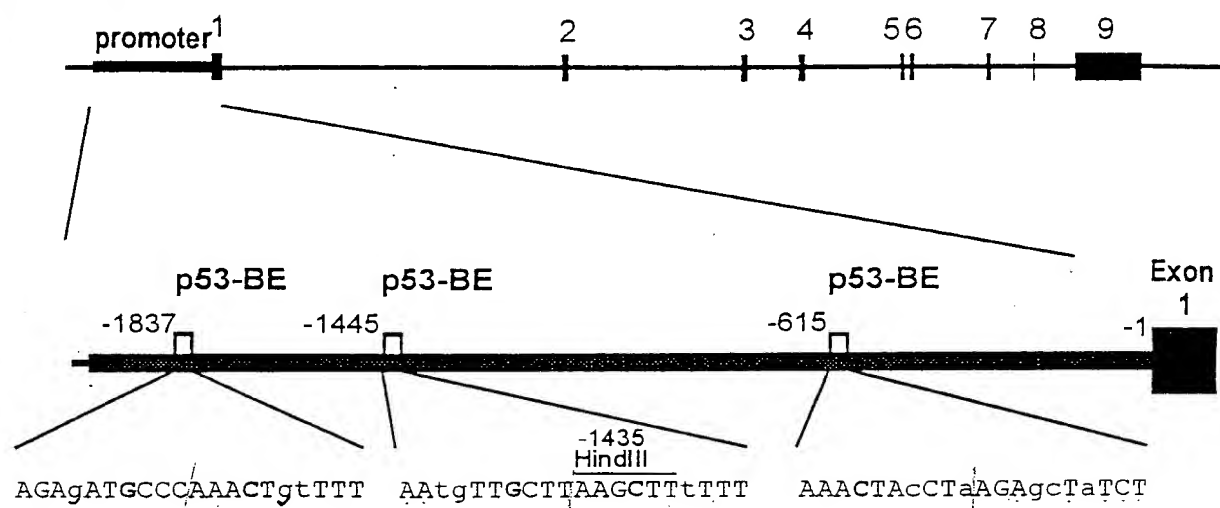


Fig. 5

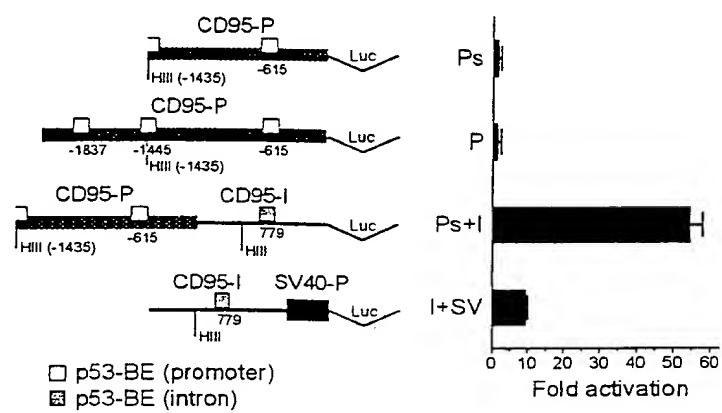


Fig. 6

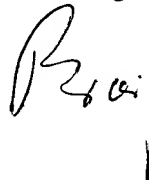


Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 198 47 779.1
Anmeldetag: 16. Oktober 1998
Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung
des öffentlichen Rechts, Heidelberg, Neckar/DE
Bezeichnung: p53-Bindungsregionen
IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Brosig

Unser Zeichen: K 2597 - hu / wd

p53-Bindungsregionen

Die vorliegende Erfindung betrifft p53-Bindungsregionen auf einer CD95-Rezeptor-DNA und die Verwendung der p53-Bindungsregionen zur Beeinflussung von Apoptose bzw. zur Identifizierung von hierfür geeigneten Substanzen.

p53 ist ein Tumorsuppressor, der bei DNA-Schäden induziert wird. Er aktiviert dann Zielgene, wodurch ein Wachstumsstillstand bei den die DNA-Schäden aufweisenden Zellen mit anschließender Reparatur der DNA-Schäden bzw. dem Tod der Zellen erreicht wird. Letzteres erfolgt durch Apoptose.

Eine Chemotherapie zielt darauf ab, in Tumorzellen DNA-Schäden zu verursachen. Diese sollen dann zur Induzierung von p53 und letztlich zum Tod der Tumorzellen führen. Vielfach zeigt sich allerdings, daß bestimmte Tumorzellen resistent gegen Chemotherapeutika sind oder nach kurzer Behandlungszeit resistent werden. Die Gründe hierfür sind bisher nicht genau bekannt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Resistenz gegen Chemotherapeutika untersucht und gegebenenfalls in sie eingegriffen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Induktion von p53 durch Chemotherapeutika zu einer direkten Aktivierung von Apoptose führt. Insbesondere hat er gefunden, daß p53 zu einer Aktivierung von CD95-vermittelter Apoptose führt, indem p53 sowohl die Expression des CD95-Liganden als auch des CD95-Rezeptors induziert. Letzteres erfolgt dadurch, daß p53 über p53-Bindungsregionen an CD95-Rezeptor-DNA bindet. Solche Bin-

dungsregionen liegen im Intron 1 bzw. dem Promotor der CD95-Rezeptor-DNA vor. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika darauf beruhen können, daß p53 nicht mehr an die vorstehenden p53-Bindungsregionen binden kann (vgl. Tabelle 1 und Figuren 1-6).

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, eine p53-Bindungsregion einer CD95-Rezeptor-DNA bereitzustellen.

Der Ausdruck "p53-Bindungsregion" umfaßt jegliche Region einer CD95-Rezeptor-DNA, an die ein p53 binden und die CD95-Rezeptor-DNA aktivieren, d.h. zur Transkription veranlassen, kann. Der Ausdruck "p53" umfaßt ein p53 in Wildtyp-Form wie auch ein p53 in veränderter Form, das vorstehende Funktion noch aufweist. Eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion kann durch übliche Verfahren identifiziert und bereitgestellt werden. Günstig ist es, eine CD95-Rezeptor-DNA (vgl. Behrmann, I. et al., Eur.J.Immunol. 24 (1994), 3057-3962) mit Sau 3A1 zu spalten und die Fragmente in die BamHI-Stelle von pBlueScript II KS⁺ zu inserieren. Die klonierten CD95-Rezeptor-DNA-Fragmente werden in DNA-Bindungsexperimente eingesetzt, in denen Zellextrakte aus den Tumorzellen H1299 verwendet werden, die vorher mit einem für p53 kodierenden Expressionsvektor, z.B. pCMVp53wt, transfiziert worden sind. Gebundene DNA-Fragmente werden mit einer Reporter-DNA, z.B. Luciferase-DNA, fusioniert. Dies kann z.B. in den Expressionsvektoren pGL3-Basic (Promega) bzw. pTATA-LUC (Wirth, T., Würzburg, Deutschland) erfolgen. Erhaltene Expressionsplasmide werden in Luciferase-Aktivitätstests auf ihre Aktivierbarkeit untersucht.

In bevorzugter Ausführungsform umfaßt eine p53-Bindungsregion die Sequenz von Fig. 4 und/oder Fig. 5 bzw. eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Sequenz. Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche Sequenz" umfaßt jegliche Sequenz einer CD95-Rezeptor-DNA, die mit der DNA von Fig. 4 und/oder Fig. 5 hybridisiert und an die ein p53 binden und die CD95-Rezeptor-DNA aktivieren kann. Die Sequenz kann sich von der DNA von Fig. 4 und/oder Fig. 5 durch Additionen, Deletionen, Substitutionen

und/oder Inversionen von ein oder mehreren Basenpaaren unterscheiden. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der Sequenz, hin.

Eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Beispielsweise kann eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion in einem Vektor, gegebenenfalls in Kombination mit einer Reporter-DNA, z.B.-Luciferase-DNA, vorliegen. Bevorzugte Kombinationen sind die DNA-Konstrukte CD95(Ps)-LUC, CD95(P)-LUC, CD95(I+SV)-LUC und CD95(Ps+I)-LUC, die in den Expressionsvektoren pGL3-Basic bzw. pTATA-LUC vorliegen (vgl. nachstehend).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion (a) und übliche Hilfsstoffe (b), wie Puffer, Lösungsmittel, Träger, Kontrollen, etc. Von der p53-Bindungsregion können ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Auch gelten die vorstehenden Ausführungen entsprechend.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, Mechanismen auf molekularer Ebene zu untersuchen, die sich bei der Schädigung von DNA ergeben. Solche Mechanismen umfassen die Reaktion der Zellen zur Behebung des DNA-Schadens bzw. zu ihrer eigenen Abtötung. Letzteres sind apoptotische Vorgänge. Die vorliegende Erfindung ermöglicht es insbesondere Mechanismen zu untersuchen, die sich bei einer Chemotherapie ergeben. Ganz besonders können Resistenzen gegen Chemotherapeutika ursächlich untersucht werden. Beispielsweise kann mit einer erfindungsgemäßen p53-Bindungsregion festgestellt werden, ob ein aus Tumorzellen stammendes p53 noch eine Apoptose induzieren kann.

Ferner eignet sich die vorliegende Erfindung Substanzen zu identifizieren, die Apoptose beeinflussen können. Diese Beeinflussung kann eine Induktion oder eine Inhibition sein. Hierzu ist es günstig, eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion in Kombination mit einer Reporter-DNA in Zellen einzuführen, diesen die

zu identifizierenden Substanzen zuzugeben, und auf die trans-aktivierende bzw. trans-inhibierende Wirkung der Substanzen zu selektieren. Mit diesen Substanzen können p53-Bindungsregionen in einer CD95-Rezeptor-DNA aktiviert bzw. inhibiert werden, wodurch eine Apoptose induziert bzw. gehemmt werden kann.

Die vorliegende Erfindung liefert somit Mittel, mit denen in apoptotische Vorgänge eingegriffen werden kann. Insbesondere kann die Resistenz gegen Chemotherapeutika angegangen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

- Fig. 1 zeigt die Expression des CD95-Rezeptors in Tumorzellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika. Klinisch relevante Konzentrationen der Chemotherapeutika sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Tumorzellen exprimieren p53, kein p53 (-/- p53) bzw. p53, das in der Bindung an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion einer CD95-Rezeptor-DNA gestört ist (mt p53).
- Fig. 2 zeigt die Antwort von mit Chemotherapeutika behandelten Tumorzellen auf die Induktion von Apoptose durch CD95-Rezeptor-Stimulation.
- Fig. 3 zeigt die Expression des CD95-Rezeptors in mit einem Chemotherapeutikum behandelten Tumorzellen, wobei die Tumorzellen erst nach Transfektion mit einem für p53 kodierenden Expressionsplasmid p53 exprimieren.
- Fig. 4 zeigt eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion (p53 BE) innerhalb des Introns 1 einer CD95-Rezeptor-DNA.
- Fig. 5 zeigt eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion (p53 BE) innerhalb des Promotors einer 9 Exons-umfassenden CD95-Rezeptor-

DNA. Der Promotor weist drei p53-Bindungsregionen auf.

Fig. 6 zeigt die Expression einer Luciferase-DNA nach Bindung von p53 an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion innerhalb eines die Luciferase-DNA enthaltenden Expressionsplasmids.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Nachweis der Expression des CD95-Rezeptors in mit Chemotherapeutika behandelten Tumorzellen (A) sowie der Antwort dieser Tumorzellen gegenüber der Induktion von Apoptose durch CD95-Rezeptor-Stimulation (B).

- (A) Die Tumorzellen HepG2 (humanes Hepatoblastom), AGS (Colonkarzinom) HS746T (Magenkarzinom), MCF-7 (Brustkrebs), Hep3B (humanes Hepatoblastom), Huh7 (Hepatocellkarzinom) und HT29 (Colonkarzinom) werden mit den Chemotherapeutika Bleomycin, 5-Fluorouracil, Methotrexat, Mitomycin und Cisplatin behandelt. HepG2, AGS, HS746T und MC-7 exprimieren ein p53, das an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion bindet. Hep3B exprimiert kein p53. Huh7 und HT29 exprimieren ein p53, das in seiner Bindung an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion gestört ist. Die Expression des CD95-Rezeptors wird durch FACScan bestimmt. Hierzu werden ein biotinylierter Anti-APO-1 (CD95-Rezeptor)-Antikörper und Quantum Red-Streptavidin (Sigma) als zweites Reagens für eine indirekte Immunfluoreszenz verwendet (vgl. Fig.1).

Es zeigt sich, daß nur die Tumorzellen HepG2, AGS, HS746T und MCF-7, deren p53 an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion bindet, eine CD95-Rezeptor-Expression aufweisen.

- (B) Die Tumorzellen HepG2, Huh7 und Hep3B (vgl. (A)) werden mit den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil, Methotrexat, Mitomycin, Cisplatin, Mitoxantron, Doxorubicin, Etoposid und Cyclophosphamid 48 h bzw. weitere 24 h in Kombination mit 100ng/ml IgG3-Anti-APO-1-Antikörper behandelt. Der Antikörper bewirkt eine CD95-Rezeptor-Stimulation. Es wird die Lebendzellrate bestimmt. Hierzu wird der MTT-Test durchgeführt, bei dem die Fähigkeit von lebenden Zellen bestimmt wird, lösliches gelbes Tetrazoliumsalz (MTT) in blaue Formazan-Kristalle zu reduzieren (vgl. Fig. 2).

Es zeigt sich, daß nur die Tumorzelle HepG2, deren p53 an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion bindet, eine verstärkte Antwort auf die Induktion von Apoptose aufweist.

Beispiel 2: Nachweis der Expression des CD95-Rezeptors in mit Bleomycin behandelten Tumorzellen, wobei die Tumorzellen erst nach Transfektion p53 exprimieren.

Die Tumorzellen Hep3B (0.6×10^6 Zellen), die normalerweise kein p53 exprimieren, werden mit 1 µg des für p53 kodierenden Expressionsvektors pCMVp53wt mittels des Calciumphosphat-Coprecipitationsverfahrens transfiziert. Anschließend werden die Tumorzellen mit Bleomycin behandelt. Es wird die Expression des CD95-Rezeptors durch FACScan bestimmt (vgl. Beispiel 1 (A); Fig. 3).

Es zeigt sich, daß durch die Expression von p53 eine Expression des CD95-Rezeptors erhalten wird.

Beispiel 3: Nachweis der Expression von Luciferase-DNA durch Bindung von p53 an eine erfindungsgemäße p53-Bindungsregion.

Es werden Expressionsplasmide hergestellt, wobei als Vektor der

Expressionsvektor pGL3-Basic verwendet wird. In diesen Vektor werden die folgenden CD95-Rezeptor-DNA/Luciferase-DNA-Konstrukte inseriert:

CD95(Ps)-LUC

Die Luciferase-DNA ist verbunden über ihr 5'-Ende mit einer 1.43 kB Promotor-Region und dem 5'-Ende von Exon 1 der CD95-Rezeptor-DNA (HindIII-SacII-Fragment, vgl. Figuren 5 und 6).

CD95(P)-LUC

Die Luciferase-DNA ist verbunden über ihr 5'-Ende mit einer 1.9 kB Promotor-Region und dem 5'-Ende von Exon 1 der CD95-Rezeptor-DNA (vgl. Fig. 5 und 6).

CD95(I + SV)-LUC

Die Luciferase-DNA ist verbunden über ihr 5'-Ende mit dem "minimal" SV40 Promotor und einem 0.7 kB Intron 1-Fragment der CD95-Rezeptor-DNA (vgl. Fig. 4 und 6).

CD95(Ps + I)-LUC

Die Luciferase-DNA ist verbunden über ihr 5'-Ende mit einem 0.7 kb Intron 1-Fragment und einer 1.43 kb Promotor-Region der CD95-Rezeptor-DNA (vgl. Figuren 4 und 6).

Die vorstehenden Expressionsplasmide (jeweils 1 μ g) werden in Hep3B Tumorzellen transfiziert. Ebenfalls wird der Expressionsvektor pCMVp53wt (jeweils 100 ng) transfiziert. Beide Transfektionen erfolgen über das Calciumphosphat-Coprazipitationsverfahren. Es wird ein üblicher Luciferase-Test durchgeführt (vgl. Figur 6).

Es zeigt sich, daß mittels der DNA-Konstrukte CD95(PS)-LUC und CD95(P)-LUC eine etwa 2-fache Aktivierung der Luciferase gegen-

über einer Kontrolle erreicht wird. Eine noch stärkere Aktivierung wird erreicht, wenn das DNA-Konstrukt CD95(I+SV)-LUC und insbesondere das DNA-Konstrukt CD95(PS+I)-LUC verwendet wird. In letzterem Fall beträgt die Aktivierung etwa den Faktor 50.

Tabelle 1

Induktion von p53, des CD95-Rezeptors und von Apoptose durch Chemotherapeutikum

Chemotherapeutikum	Wirkungsmechanismus	p 53-Induktion	Induktion von Apoptose	CD95 Rezeptor-Induktion	erhöhte Antwort gegenüber Induktion von Apoptose durch CD95 Rezeptor-Stimulation
Fluorouracil	Antimetabolit	+	+	+	+
Methotrexat	"	+	+	+	+
Mitomycin	Alkylierung	+	+	+	+
Cisplatin	"	+	+	+	+
Cyclophosphamid	"	+	+	+	+
Mitoxantron	Interkalierung	+	+	+	+
Doxorubicin	"	+	+	+	+
Etoposid	Mitose-Blockierung	+	+	+	+
Bleomycin	Inhibierung der DNA Polymerase	+	+	+	+

* Test auf Synergismus zwischen CD95-Rezeptor-Stimulation durch anti-AP0-1 und gleichzeitiger chemotherapeutischer Behandlung: $p < 0.0001$

K 2597

Patentansprüche

1. p53-Bindungsregion einer CD95-Rezeptor-DNA.
2. p53-Bindungsregion nach Anspruch 1, wobei sie die Sequenz von Fig. 4 und/oder Fig. 5 bzw. eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare
5 unterschiedliche Sequenz umfaßt.
3. Vektor, umfassend die p53-Bindungsregion nach Anspruch 1 oder 2.
4. Vektor nach Anspruch 3, wobei er ferner eine Reporter-DNA umfaßt.
10
5. Verwendung der p53-Bindungsregion nach Anspruch 1 oder 2 bzw. des Vektors nach Anspruch 3 oder 4 zur Identifizierung von Apoptose beeinflussenden Substanzen.
- 15 6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Beeinflussung eine Induktion oder eine Inhibition von Apoptose umfaßt.
7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Substanzen im Rahmen einer Chemotherapie eingesetzt werden.
20
8. Verfahren zur Beeinflussung von Apoptose, umfassend die Aktivierung oder Inhibierung der p53-Bindungsregion nach Anspruch 1 oder 2.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Beeinflussung im Rahmen einer
25 Chemotherapie erfolgt.

K 2597

Zusammenfassung

5

p53-Bindungsregionen

Die vorliegende Erfindung betrifft p53-Bindungsregionen auf einer CD95-Rezeptor-DNA und die Verwendung der p53-Bindungsregionen zur Beeinflussung von Apoptose bzw. zur Identifizierung von hierfür geeigneten Substanzen.

10



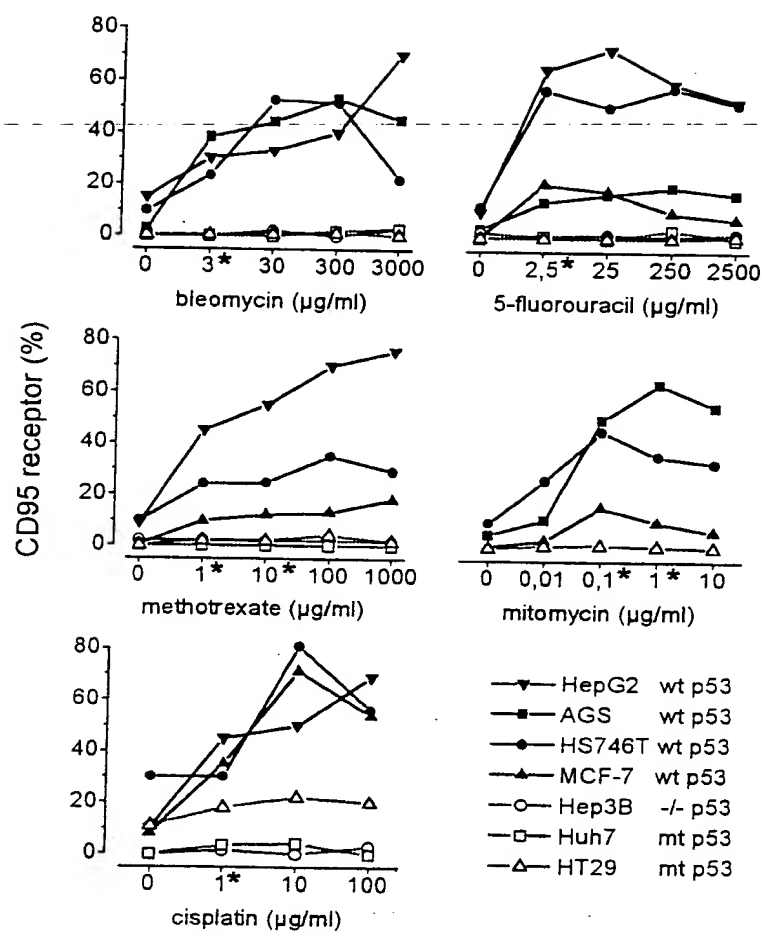


Fig. 1

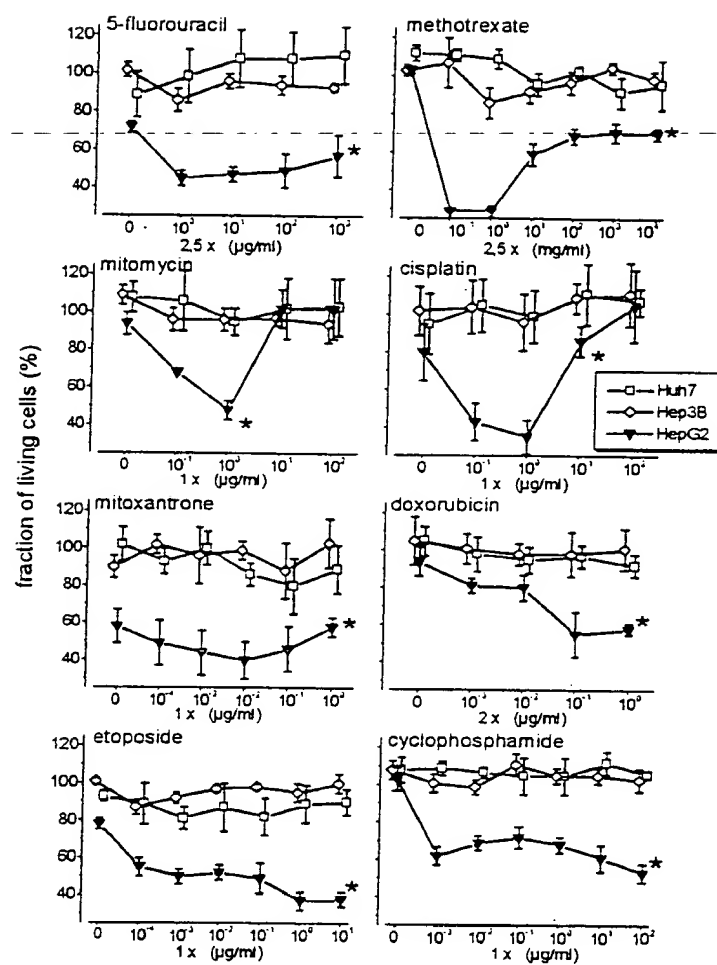


Fig. 2

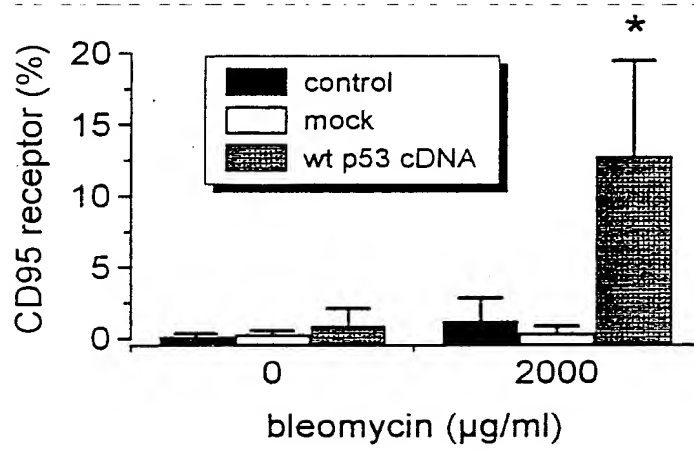


Fig. 3

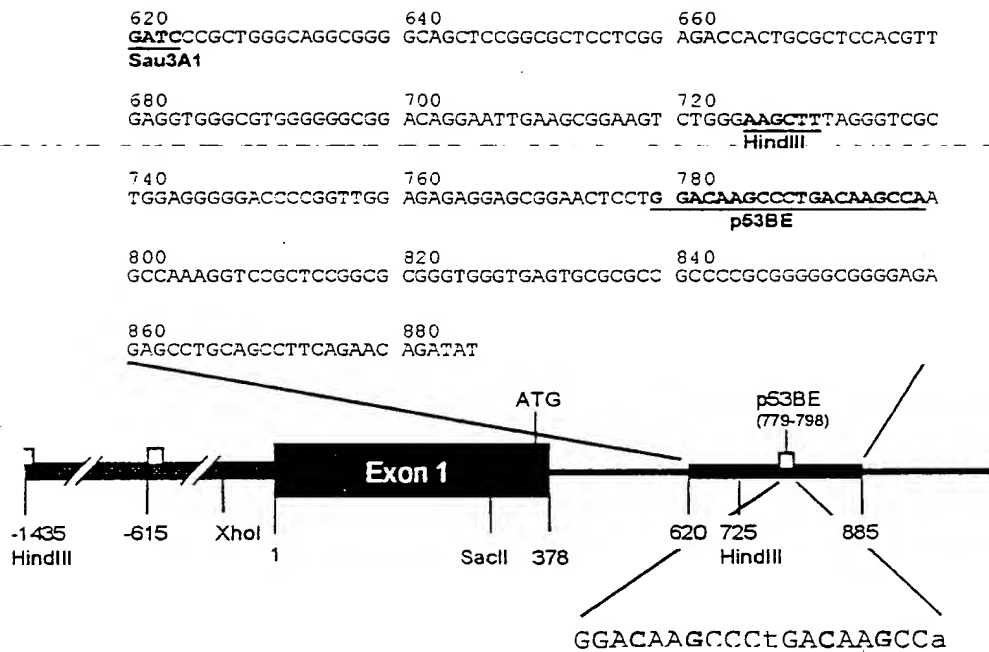


Fig. 4

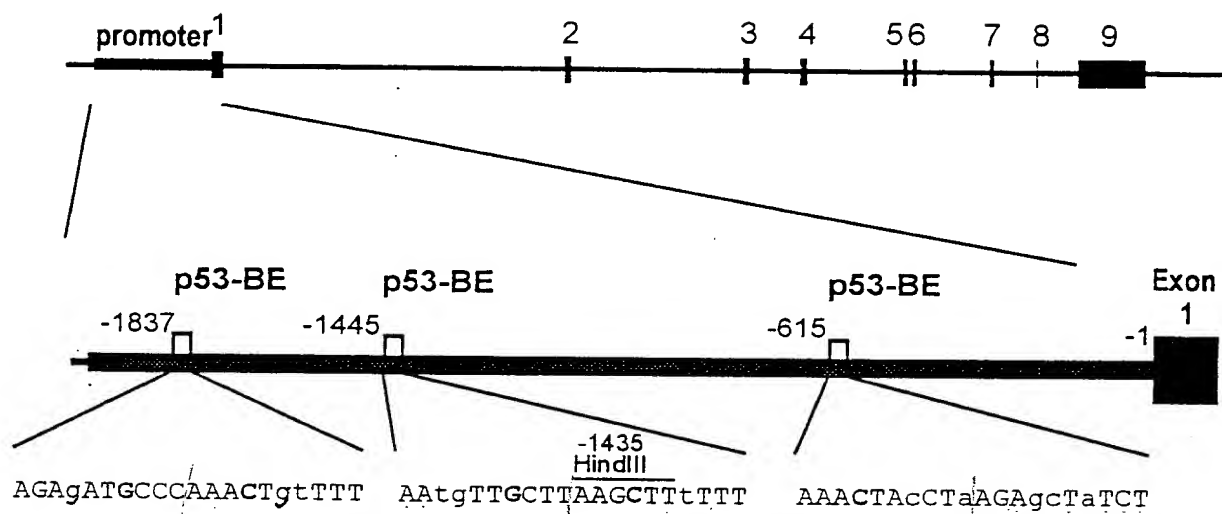


Fig. 5

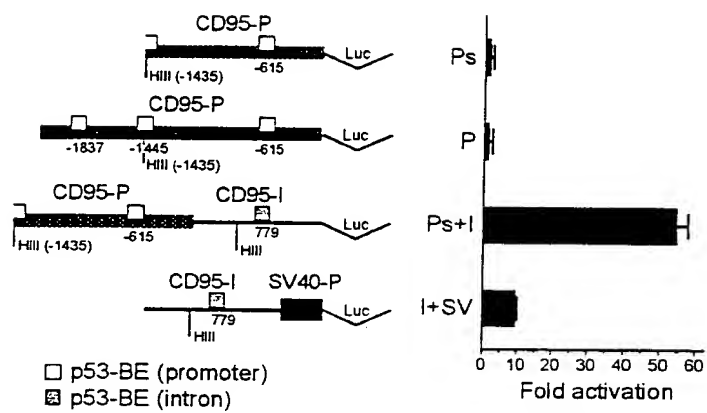


Fig. 6